

Cvičení z fyziologie rostlin

Organogeneze *in vitro*

Teoretický úvod:

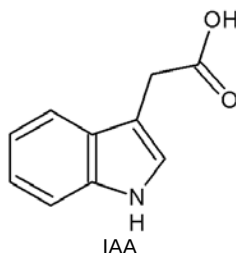
Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin je složení kultivačního média. Média používaná pro kultivaci rostlinných pletiv či orgánů obsahují potřebné množství makro a mikroprvků, vitamínů, aminokyselin, cukrů a dalších látek. Nejčastěji se používají média Murashige a Skoog (MS, 1962), White (1963) a Nitsch a Nitsch (1969).

Růst a vývoj rostlin je regulován interakcemi mezi jednotlivými rostlinnými hormony, mezi které klasicky zařazujeme těchto pět skupin látek: gibberelliny, auxiny, cytokininy, kyselinu abscisovou a ethylen. Mezi rostlinné regulátory rostlin dále patří oligosacharidy, brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová a polyaminy. Skupina látek ovlivňující klíčení a růst rostlin se i nadále rozrůstá a zatím není zcela objasněn vliv např. turgorinů nebo strigolů.

Oproti živočišným hormonům jsou rostlinné méně specifické a jsou zapojeny do vývojových regulací s vyšší komplexitou, mohou působit zároveň mnoho odlišných efektů nebo jen jeden jakýkoliv z nich v závislosti na místních podmínkách uvnitř rostliny. Dalším jejich podstatným rysem je jejich kooperativní působení. Jejich hlavní efekt tak může být závislý na dynamické rovnováze hormonů, která je dosažena ve specifických stádiích rostlinného růstu či vývoje.

AUXINY

Primárním auxinem v rostlinách je IAA (indol-3-pyruvát kyselina), dále zde patří látky jako IBA (kyselina indolylmásečná), fenoloxetová kyselina, kyselina naftoloxetová (NAA), 2,4,5-trichlorfenoloxetová (2,4,5T), kyselina 2,4-dichlorfenoloxetová (2,4-D nebo 4-chloro-IAA). Efekt auxinů IBA a dalších derivátů IAA je přisuzován konverzi těchto látek na IAA.



Auxiny mohou být v rostlinách syntetizovány tryptofan-dependentní a independentní dráhou. V rostlinách se nachází auxiny ve formě volné a vázané. Volné jsou rychle difundovány z/do pletiv a mohou tak rychle regulovat fyziologické procesy. Vázané auxiny jsou ve formě konjugátů s aminokyselinami, peptidy, sacharidy a jsou proto rezervní a zásobní formou, která může být příslušným enzymatickým krokem aktivována.

Některé funkce auxinů

- prodlužovací růst
- buněčné dělení v kambiu
- buněčné dělení a tvorba kořenů

Adventivní a postranní kořeny se zakládají v pericyklu což je podporováno auxiny, proto jsou (zejm. IBA) součástí mnohých komerčně dostupných zakořeňovacích stimulátorů (AS-1, Kostim, atd.)

- buněčné dělení v tkáňových kulturách

Auxiny podporují buněčné dělení a prodlužovací růst buněk. Proto jsou hojně používány v tkáňových kulturách rostlin, zejm. k zakořeňování explantátů a propagulí před jejich přenosem do *in vivo* podmínek.

- apikální dominance

Z vrcholové části hlavního stonku (apexu) vycházejí vlivy inhibující vývoj postranních pupenů. Odstraněním vrcholu vede k rašení postranních pupenů. Odřízneme-li vrchol a na řeznou ránu aplikujeme IAA, zůstanou postranní pupeny dále inhibovány. IAA má zde jen nepřímý účinek: indukuje tvorbu ethylenu v postranních vrcholech a ten pak inhibuje.

- senescence (opad) plodů a listů

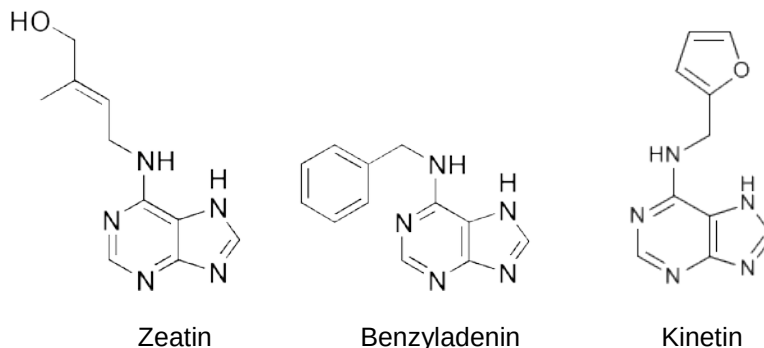
IAA stimuluje, tak i inhibuje vytváření oddělovací zóny v listech a v plodech. Proto se řada syntetických auxinů používá k umělé defoliaci rostlin či k řízenému opadu přebytečných plodů. Působení auxinu je zde shodné s efektem jiných látek ovlivňujících senescenci, a to kyseliny abscisové (ABA) a ethylenu.

- partenokarpie

CYTOKININY

Patří zde N6 substituované deriváty adeninu: kinetin, isopentenyladenin a další. Stejně jako auxiny mohou být vázané i volné (báze, viz struktury). Vázané cytokininy jsou ve formě glukosidů nebo jako deriváty alaninu. Glukosidy jsou pravděpodobně transportní a rezervní formou, deriváty alaninu vznikají nevratnou detoxifikací. Cytokininy jsou deaktivovány oxidativním štěpením nebo N-konjugací s glukosou nebo alaninem.

Cytokininy jsou syntetizovány v kořenech a následně jsou transportovány skrz xylém do prýtu.



Některé funkce cytokininů

- podpora buněčného dělení

Cytokininy společně s auxiny podporují dělení buněk a tvorbu kalusu. Změny poměru jejich koncentrací způsobí vývoj různých částí rostliny, jejich působení je antagonistické.

- oddálení senescence

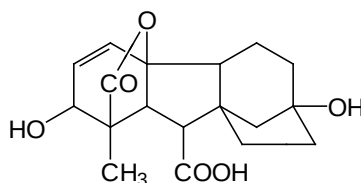
Cytokininy zpomalují opad (senescenci) listů a plodů. Inhibují rozpad listového chlorofylu a tím též přispívají k oddálení senescence.

- syntéza betacyaninu ve tmě
- aktivace enzymů

Fyziologický účinek cytokininů závisí také na příslušné rostlině a hlavně koncentraci aplikovaného cytokininu. Kinetin aplikovaný na kořeny v nízkých koncentracích stimuluje fotosyntézu a růst, přesto dochází k inhibici růstu kořenu i rostliny, pokud jsou kořeny vystaveny účinku kinetinu po delší dobu (2 dny).

GIBBERILLINY

Doposud bylo identifikováno více jak 112 gibberellinů. Jsou to terpenoidy syntetizovány skrze kyselinu mevalonovou a jejich syntéza vedoucí k daným gibberellinům je odlišná a unikátní v různých rostlinách. Pouze pár těchto látek je skutečně aktivních, většinou jsou to prekuzory nebo deaktivované formy.



GA3

Některé funkce gibberellinů

- buněčné dělení a prodlužování spojené se stimulací růstu
- buněčné dělení v kambiu

Gibberelliny aktivují spolu s IAA buněčné dělení v kambiu na jaře.

- partenokarpie

Partenokarpie jabloní, rajčat, a okurek může být, podobně jako IAA, vyvolána i gibberelliny.

- indukce kvetení

U dlouhodených rostlin a u celé řady rostlin s požadavkem nízkých teplot mohou gibbereliny vyvolávat kvetení v neinduktivních podmínkách odpočinek (dormance) pupenů. Zkracující se délka dne vyvolává v pupenech našich dřevin dormanci, neboť se v nich hromadí inhibiční látky (např.

kyselina abscisová). Dormanci lze zrušit působením nízkých teplot, což má za následek zvýšení hladiny endogenních gibberellinů působících na pupeny aktivačně.

- apikální dominance

Aplikace gibberellinu zesiluje stávající apikální dominanci.

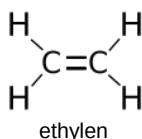
- porušení odpočinku semen

Celá řada rostlin klíčí pouze za určitých podmínek, např. po ozáření červeným světlem. V mnoha případech lze vyvolat klíčení těchto semen i ve tmě a to po ošetření gibberellinem.

Z výše uvedeného je zřejmé, že IAA a gibberelliny ovlivňují mnohé vývojové procesy rostlin obdobně. Předpokládá se, že gibberelliny ovlivňují endogenní hladinu IAA.

ETHYLEN

K objevu fyziologických účinků ethylenu došlo v Německu na přelomu století. Stromy vysazené v blízkosti plynových lamp pouličního osvětlení shazovaly zdánlivě bezdůvodně listy. Defoliaci způsoboval ethylen přítomný ve svítiplynu. Biosyntéza ethylenu je odvozena od aminokyseliny methioninu.



Některé funkce ethylenu

- zrání plodů

Ethylen silně podporuje zrání všech plodů. V zemědělství se využívá při sklizni nezralých plodů a jejich uskladnění ve speciálních boxech bez přístupu ethylenu, který je do nich vháněn těsně před jejich prodejem.

- abscise

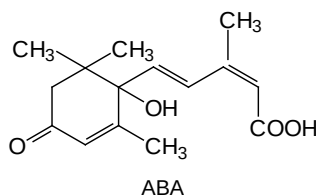
Ethylen podporuje abscisi (opad) listů, květů a plodů celé řady rostlinných druhů.

- determinace pohlaví rostlin

Ethylen se významně podílí na regulaci pohlaví rostlin a je spojen s podporou násady samičích květů.

KYSELINA ABSCISOVÁ

Též v minulosti zvaná abscisin II nebo dormin, někdy označovaná zkratkou ABA (z angl. Abscise Acid). Má hlavně inhibiční efekt.



Některé funkce ABA v rostlinách

- senescence

Aplikací malé kapky roztoku ABA lze vyvolat žloutnutí ošetřené plošky, zbytek listu zůstane zelený. Tento efekt je opačný k účinku cytokininů.

- ABA ovlivňuje vývoj semen

Hladina ABA se zvyšuje v průběhu ranných stadií vývoje semen. Nárůst stimuluje produkci zásobních proteinů a je zodpovědný za zabránění předčasného klíčení..

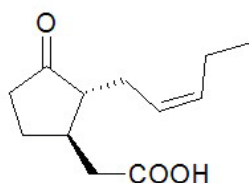
- ABA a hospodaření s vodou

ABA stimuluje zavírání průduchů a tím reguluje i transpiraci rostlin.

KYSELINA JASMONOVÁ

Chemicky se jedná o 3-oxo-2-(2'-cis-penetnyl)cyklopentan-1-octovou kyselinu. Biosyntéza kyseliny jasmonové vychází z α -linolenové kyseliny.

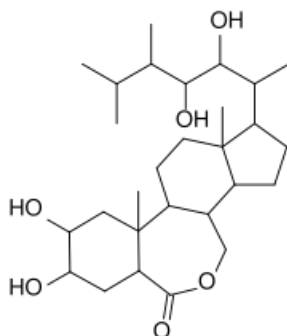
Ve zvýšené koncentraci se vyskytuje v rostlinách při biotickém či abiotickém stresu.



Kyselina jasmonová

BRASSINOSTEROIDY

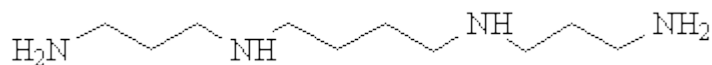
Brassinosteroidy jsou v rostlinách přítomny v extrémně nízkých koncentracích. Do roku 2000 bylo objeveno 56 přirozených brassinosteroidů a stále ještě přibývají. Mnoho vývojových procesů, které jsou ovlivněny brassinosteroidy, je zároveň řízeno i auxinem (prodlužování stonku a kořenů, klíčení semen, apikální dominance aj.). Brassinosteroidy jsou závislé na změnách poměru auxinu/cytokininu v rostlinných tkáních.



Brassinolid

POLYAMINY

Patří zde skupina alifatických aminů s nerozvětveným řetězcem. Vznikají biosyntézou z aminokyselin. Patří zde spermin (SPM), spermidin (SPD), kadaverin a putrescin (PUT). Univerzální výskyt PUT, SPD a SPM v rostlinných orgánech vede k předpokladu, že PA plní důležité funkce v regulaci růstu rostlin. Prokázalo se, že se polyaminy podílejí na procesech, které chrání rostliny před stresem. Ve své volné formě (endogenní i při exogenní aplikaci) fungují faktory zamezující stárnutí. Hlavní účinky v ovoci jsou: zpomalení barevných změn, zvýšení pevnosti ovoce, oddálení emise etylenu a zpomalení respirace, umělé vytváření (indukování) mechanické rezistence aj.



Spermin

Experiment:

„Vliv rostlinných hormonu kinetinu a IAA na vývoj tabáku v *in vitro* podmínkách“

Cíl experimentu:

Cílem experimentu je zjistit, jaký vliv mají různé koncentrace kinetinu a IAA na organogenezi tabáku a určit, která část rostliny je pro toto uspořádání nejvhodnější.

Rostlinný materiál:

Sterilní rostliny tabáku

Potřeby a chemikálie:

Petriho misky, 6-jamkové sterilní plastové destičky, kádinky, odměrné válce, pipety, zásobní roztoky mikro prvků a vitamínů, chemikálie pro přípravu média (viz tabulka), destilovaná voda, pevné látky kinetinu a IAA, NaOH, ethanol, sterilní nástroje.

Provedení experimentu:**1.část: Příprava MS média**

1. Navážíme přesné množství látek podle výše uvedené tabulky a rozpustíme v kádince přibližně ve 400 mL destilované vody. Do výsledného roztoku pipetujeme také uvedené množství vitamínů a mikroprvků ze zásobních roztoků. Po rozpuštění všech složek upravíme pH tohoto roztoku pomocí elektronického pH -metru na hodnotu 5,6 .

2. Přidáme 8 g agar a 30 g sacharozy a po rozpuštění roztok doplníme na objem 1 L.

Murashige-Skoog médium

Látka	Koncentrace v médiu mg/L	Zásobní roztok	Množství v mL do 1 L média
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
KNO ₃	1900	-	-
CaCl ₂ *2H ₂ O (CaCl ₂)	440 (332)	-	-
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	-	-
KH ₂ PO ₄	170		
H ₃ BO ₃	6,2		
MnSO ₄ * 4H ₂ O(H ₂ O)	22,3 (15,6)		
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6		
K I	0,83	83 mg/100mL	10
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25	2,5 mg/100mL	10
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	2,5 mg/100mL	10
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025	2,5 mg/100mL	10
Chelaton3 (Na ₂ EDTA)	37,2		
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8		
Nicotinic acid	0,5	5 mg/50mL	5
Pyridoxin	0,5	5 mg/50 mL	5
Thiamin	0,1	10 mg/50 mL	0,5
Glycin	2	10 mg /50 mL	10
inositol	100	0,5 mg/50 mL	10
sacharoza	30 000		
agar	8 000		

4. Připravíme si roztoky rostlinných hormonů.

3 mg IAA rozpustíme v malém množství čistého ethanolu a opatrně přidáváme teplou destilovanou vodu do konečného objemu 10 mL. Pozor, IAA se sráží z roztoku!

1 mg kinetinu rozpustíme nejdříve v kapičce 1M NaOH a poté doplníme destilovanou vodou do 10 mL.

5. Nakonec rozlijeme médium po 200 mL do 250mL láhví a popíšeme je podle následující tabulky na variantu č.1 až 5. Do 200 mL čistého MS média napipetujeme uvedené množství roztoků IAA a kinetinu. Sterilizaci roztoků provede vedoucí cvičení.

Varianta	1	2	3	4	5
Koncentrace IAA	3 mg/L	0,3 mg/L	0,03 mg/L	0	0
Koncentrace Kinetinu	0,2 mg/L	0,02 mg/L	1 mg/L	0,2mg/L	0
IAA	2 mL	0,2 mL	0,02 mL	0	0
kinetin	0,4 mL	0,04 mL	2 mL	0,4 mL	0

2.část : Příprava nádob na pěstování tabáku a očkování média rostlinným materiálem

Základní podmínkou kultivace *in vitro* je zajištění sterilních podmínek v celém průběhu práce. Média svým složením představují živnou půdu nejen pro explantát, ale i pro většinu plísní a bakterií .

1. Jednotlivé skleněné láhve se sterilním MS médiem ohřejeme v mikrovlné troubě tak, že před samotným ohřevem odstraníme alobal a lehce uvolníme víčko. Přihříváme na nejvyšší výkon trouby až do úplného rozpuštění (přibližně 3 minuty).

2. Láhve opatrně přeneseme do předem vyčištěných flowboxů a poté postupně rozléváme přibližně 5 mL média na jamku v 6-jamkové destičce nebo 15ml média do petriho misky. Rozléváme vždy jednu variantu MS média na danou 6-jamkovou destičku a nebo petriho misku a vše důkladně popíšeme. Přikryjeme víčky a necháme ztuhnout ve spuštěném flowboxu.

3. Na připravené sterilní misky rozdělíme jednotlivé části tabáku. Kořeny nařežeme sterilním skalpelem na 1 - 1,5 cm kusy a pokládáme tři na jednu jamku nebo malou petriho misku.

Stonky tabáku nařežeme na válce, z kterých se pokusíme vypreparovat dužinu a tu pak nakrájíme na tenké řezy a po třech pokládáme do jamek.

Listy tabáku nastříháme sterilními nůžkami na čtverečky (0,5x0,5 cm) a taky rozložíme po třech do jamek.

Dodržujte sterilní podmínky při práci ve flowboxu.

Po čtyřech týdnech vyhodnotit.

Úkoly:

1. Jaký význam mají pro rostliny cytokininy a auxiny ?
2. Uveďte příklad, jak se dají používat rostlinné hormony v praxi.
3. Které hormony ovlivňují defoliaci rostlin?